

УДК 577.11:579.841.21:577.14:579.663

БИОПОЛИМЕР АЛЬГИНАТНОЙ ПРИРОДЫ С ПРЕОБЛАДАНИЕМ L-ГУЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2011 г. Я. О. Логинов, Г. Г. Худайгулов, С. П. Четвериков, А. И. Мелентьев, О. Н. Логинов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054

e-mail: che-kov@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2010 г.

Получен высоковязкий биополимер из *Azotobacter vinelandii* – полисахарид альгинатной структуры с преобладанием α-L-гулурановой кислоты ($M/G = 0.22$), молекулярная масса которого в интервале 250–350 кДа. При культивировании на среде с мелассой выход экзополисахарида составил 20.5 ± 0.5 г/л при вязкости культуральной жидкости свыше 30000 сСт. Биополимер стабилен в диапазоне pH 4.0–9.0 в широком интервале температур, хорошо растворяется в высокоминерализованной воде, сохраняя высокий уровень вязкости, и может использоваться в нефтяной промышленности для повышения нефтеотдачи.

Известно, что бактерии, принадлежащие к роду *Azotobacter vinelandii*, при глубинном культивировании образуют значительные количества экзополисахарида (ЭПС), который представлен как в виде капсул, окружающих бактериальные клетки, так и в виде аморфной слизи, распространяющейся в питательной среде [1]. Считается, что в природных условиях обитания формирование удерживающих влагу цист способствует выживанию клеток в неблагоприятных условиях [2], а полисахаридный гель, снижая диффузию молекулярного кислорода, защищает нитрогеназную систему от вредного воздействия [3].

В настоящее время химическая структура ЭПС *A. vinelandii* установлена. Это линейный полисахарид альгинатной природы, построенный из остатков D-маннурановой кислоты и ее C-5-эпимера, L-гулурановой кислоты в различной последовательности и соотношении [4, 5].

Благодаря способности воздействовать на реологические свойства водных систем при малых концентрациях бактериальные ЭПС могут найти применение в пищевой, медицинской, фармацевтической областях промышленности и сельском хозяйстве [6, 7]. Реологические свойства альгинатов и их способность формировать гели зависят от молекулярной массы полимера и соотношения остатков маннурановой и гулурановой кислот. Соотношение этих мономеров в бактериальных альгинатах варьирует в зависимости от вида (штамма) и условий культивирования [8].

Ранее было обнаружено, что штамм *A. vinelandii* ИБ 1 при культивировании в среде с мелассой продуцирует до 16 г/л экзополисахарида, отличающегося высокой вязкостью и стабильностью в высокоминерализованных водных растворах [9]. Однако химическая структура и другие характе-

ристики этого биополимера не были досконально исследованы.

Цель работы – установление химической природы ЭПС из *A. vinelandii* и оценка физических свойств образуемых им гелей.

МЕТОДИКА

Использовали штамм бактерии *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 из Коллекции микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН, который первоначально был описан, как штамм бактерий для получения биопрепарата для борьбы с болезнями пшеницы, вызываемыми грибными фитопатогенами, и повышения урожая [10].

Для поддержания культуры, подготовки посевного материала и культивирования использовали питательную среду Федорова следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.3, $CaHPO_4$ – 0.2, $MgSO_4$ – 0.3, K_2SO_4 – 0.2, $NaCl$ – 0.5, $FeCl_3$ – 0.01, $CaCO_3$ – 5.0, меласса – 60.0. Использовали мелассу (ООО “Карламанский сахар”, Россия), содержащую сахарозу (50–53%), микроэлементы, органические кислоты [11].

Культивирование проводили в периодических условиях в ферментерах АК-210 (“СКБ БП”, Пушкино, Россия) с рабочим объемом 6 л при 25°C с непрерывным перемешиванием, частотой вращения мешалки 300 мин^{-1} , аэрацией – 0.5 объема воздуха в 1 мин на 1 объем среды.

Определение содержания сахарозы в культуральной жидкости в процессе биосинтеза ЭПС проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в системе, состоящей из насоса высокого давления модели 572P (“Gasukuro Kogyo”, Япония), детектора-рефрактометра (“Du Pont”, США). Для разделения использовали колонку из нержавеющей стали с

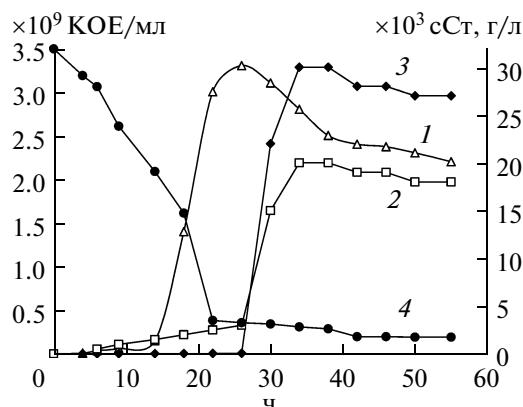


Рис. 1. Динамика биосинтеза ЭПС и изменения вязкости культуральной жидкости при периодическом культивировании *A. vinelandii* ИБ 1, 1 – титр клеток, $\times 10^9$ КОЕ/мл, 2 – ЭПС, г/л, 3 – вязкость, $\times 10^3$ сСт, 4 – сахароза, г/л.

сорбентом (размер зерна 5 мкм) НР – NH₂ (250 × 4.6 мм, “Hewlett Packard”, США). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил–вода (75 : 25) с расходом 1 мл/мин.

Определение кинематической вязкости культуральной жидкости осуществляли при помощи стеклянного капиллярного вискозиметра Оствальда при 20°C (значения в сантистоксах (сСт) или мм²/с), динамической вязкости культуральной жидкости – с использованием ротационного вискозиметра ВСН-3 (ОАО “Азнефтьхиммаш”, Азербайджанская Республика) при 20°C, скорости вращения гильзы 600 мин⁻¹ и перемешивании исследуемой жидкости в течение 10 мин (значения в сантипуазах (сП) или Па с).

ЭПС выделяли из культуральной жидкости переосаждением изопропиловым спиртом (70% по объему). Осадок промывали чистым изопропиловым спиртом, холодной водой и сушили до постоянной массы [12].

Молекулярную массу (ММ) ЭПС оценивали методом гель-фильтрации в вышеописанной системе на колонке TSK G4000SW (300 × 7.8 мм, “Toyo Soda”, Япония) при элюировании 0.15 М хлоридом натрия с расходом 1 мл/мин. В качестве стандартов использовали декстраны.

ИК-спектры записывали на спектрофотометре Specord M 80 (“Carl Zeise”, Германия) в области 4000–600 см⁻¹ (толщина пленки 15–20 мкм).

Спектры ЯМР ¹H регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 300 МГц для 2%-ного раствора полисахарида при 80°C, растворитель – D₂O.

Спектры ЯМР ¹³C регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 75.47 МГц для 2%-ного раствора полисахарида, растворитель – D₂O.

Изучение термостабильности геля ЭПС проводили при 4-кратном нагревании до 100°C и охлаждении до 20°C. Влияние pH среды на стабильность ЭПС (динамическая вязкость) определяли при 20, 40, 60, 80°C в 0.05 М фосфатной буферной системе в соотношении ЭПС–фосфатная буферная система 3 : 1 в диапазоне pH 2.0–11.0. ЭПС выдерживали в этой системе в течение 30 мин. Влияние солей металлов на стабильность ЭПС исследовали при их концентрации 150 г/л. Использовали хлориды, нитраты и сульфаты калия, натрия, кальция, магния, марганца и железа. Результаты по исследованию стабильности представлены в процентах относительно исходной вязкости ЭПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *A. vinelandii* ИБ 1 при культивировании на среде с мелассой синтезировал высоковязкий ЭПС, его выход составлял 20.5 ± 0.5 г/л (рис. 1). Вязкость получаемой культуральной жидкости при этом была свыше 30000 сСт. Накопление ЭПС до 20 ч культивирования было незначительным, без увеличения вязкости. По завершении логарифмической фазы роста потребление сахарозы практически прекращалось, о чем свидетельствовало резкое снижение ее концентрации в среде к данному моменту. При переходе в стационарную фазу роста культуры (28 ч) происходил резкий, в течение 1 ч, скачок в образовании ЭПС и увеличение вязкости среды до 15000 сСт. Последующее увеличение вязкости (до 30000 сСт), возможно, связано с продолжением синтеза полисахарида, увеличением его молекулярной массы, а также с реструктуризацией образовавшегося ЭПС, как, например, на заключительной стадии биосинтеза альгиновых кислот, где D-маннуроновая кислота ферментативно эпимеризуется в L-гулурановую кислоту, отвечающую за свойства геля [13]. В целом, характер накопления ЭПС и возрастания вязкости среды согласуется с данными других авторов, отмечавших резкое повышение концентрации альгинатов *A. vinelandii* по завершении логарифмического роста [14, 15].

Посредством гель-фильтрации показано, что продуцируемый штаммом *A. vinelandii* ИБ 1 полисахарид выходит из колонки одним асимметричным пиком, ограниченными значениями молекулярных масс примерно от 250 до 350 кДа (рис. 2). Согласно данным, представленным в обзоре Галлиндо и др. [16], молекулярная масса альгинатов различных штаммов *A. vinelandii* варьирует в достаточно широких пределах – от 340 до 4000 кДа, кроме того, эта величина в определенной мере зависит от способа культивирования (колбы или ферментационный аппарат).

В ИК-спектре полисахарида обнаружены сигналы, характерные для полос поглощения ацетильных групп 1730, 1250 см⁻¹, полосы поглоще-

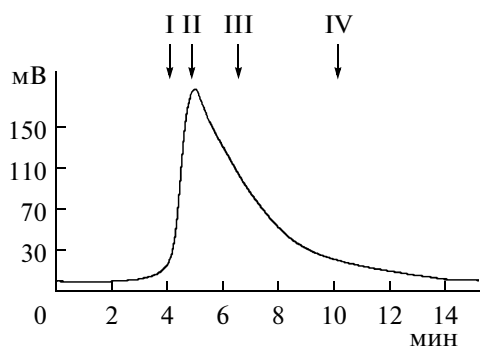


Рис. 2. Гель-хроматограмма ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1 на TSK G4000SW, 300x7.8 мм (“Тоуо Soda”, Япония) при элюировании 0.15 М хлоридом натрия, расход 1 мл/мин; кДа: I – 500, II – 300, III – 200, IV – 100.

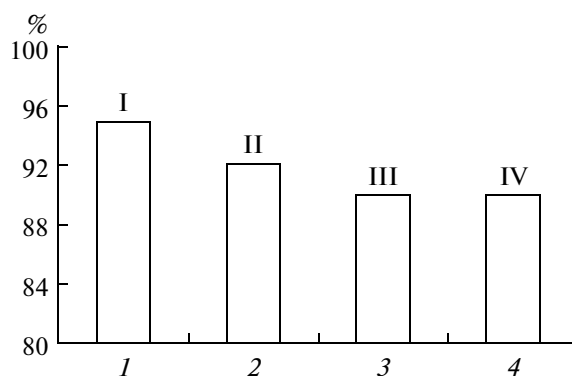


Рис. 3. Влияние кратности нагревания (1–4) до 100°C и охлаждения до 20°C на вязкость (% от исходной) ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1. I – 95, II – 92, III – 90, IV – 90.

ния валентных колебаний пиранозного кольца гулурановой кислоты (Г) 1290 и 787 см⁻¹, и полосы поглощения валентных колебаний пиранозного кольца маннурановой кислоты (М) 1320 и 808 см⁻¹.

Из спектров ЯМР ¹H и ¹³C полисахарида видно, что в его структуре содержится по 10 пиков (табл. 1, 2), типичных для спектров альгинатов. Таким образом, на основе данных ИК- и ЯМР-спектроскопии показано, что выделенный полисахарид построен из 1–4-связанных остатков β-D-маннурановой и α-L-гулурановой кислот.

Исходя из данных ИК-спектроскопии, представляется возможным рассчитать величину М/Г, как соотношение интенсивностей полос поглощения при 808 (М) и 787 см⁻¹ (Г) [13]. Для исследуемого полисахарида *A. vinelandii* ИБ 1 величина М/Г = 0.22. Это соотношение подтверждается и данными ЯМР-спектроскопии: отношение суммы интегральных интенсивностей сигналов С1–С5 остатков β-D-маннурановой кислоты к соответствующей сумме интегральных интенсивностей сигналов С1–С5 остатков α-L-гулурановой кислоты дает ту же величину.

Вязкость и способность к гелеобразованию альгинатных полисахаридов определяется, главным образом, высоким содержанием α-L-гулурановой кислоты (относительной длиной Г-блоков в полимерной цепи) и степенью наличия ацетильных групп. Имеющиеся в литературе данные различных авторов по вязкостным характеристикам альгинатов *A. vinelandii* трудно сопоставимы ввиду отсутствия полноты сведений по концентрации ЭПС, плотности культуральной жидкости, скоростей сдвига при определении кинематической вязкости и других параметров. Наиболее приемлемыми для сопоставления с нашими результатами можно считать данные Галиндо и др. [16], согласно которым вязкость культуральной среды (0.6% ЭПС), установленная при скоро-

сти сдвига 12 с⁻¹, составляла 560 сП. В наших экспериментах при концентрации ЭПС в среде 2.0%, кинематическая вязкость составила 9100 сП при скорости сдвига 10 с⁻¹, ММ ЭПС существенно ниже (250–350 кДа) против 1500–1900 кДа у цитируемых авторов [16], а уровень накопления ЭПС в культуральной среде выше примерно в 3 раза.

Известно, что бактериальные альгиновые кислоты обычно ацетилированы в положении 2 и (или) 3 остатков D-маннурановой кислоты. Причем содержание более чем 22% ацетильных групп характерно для альгинатов, состоящих из 55% остатков маннурановой кислоты, тогда как полимеры, содержащие до 4% ацетильных групп, состоят в основном из остатков L-гулурановой кислоты [17]. Данные ИК- и ЯМР-спектроскопии исследуемого полисахарида указывают на наличие 8% ацетильных групп, что, вкупе с уникально высоким содержанием α-L-гулурановой кислоты (82%), обуславливает его высокие вязкостные характеристики. Ранее считалось, что для бактериальных альгинатов максимальное содержание α-L-гулурановой кислоты находится на уровне 56% [18].

Для возможного практического использования ЭПС важной характеристикой является их вязкость в зависимости от условий среды. Из рис. 3 видно, что 4-кратное нагревание до 100°C с последующим охлаждением до 20°C не оказывало

Таблица 1. Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ¹H ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1

Кислота	Химический сдвиг, м. д.				
	H1	H2	H3	H4	H5
D-маннурановая кислота	4.79	4.74	4.69	4.72	4.67
L-гулурановая кислота	4.84	4.72	4.74	4.76	4.82

Таблица 2. Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ^{13}C ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1

Кислота	Химический сдвиг, м.д.				
	C1	C2	C3	C4	C5
D-маннуриновая кислота	105.82	70.84	71.31	78.70	77.56
L-гулуриновая кислота	106.51	65.72	68.83	82.61	68.83

существенного деструктивного влияния на гель ЭПС, то есть его вязкость падала незначительно и была обратима. Это свойство ЭПС может иметь решающее значение при использовании в условиях нефтяных месторождений с высокой пластовой температурой для обеспечения более полного извлечения нефти из нефтяных пластов.

Оценка влияния pH среды на стабильность биополимера (рис. 4) показала, что экзополисахарид при 20°C сохранял стабильную вязкость в диапазоне pH 4.0–8.0 с незначительным снижением вязкости при pH 9.0. Повышение температуры до 40°C изменяло этот диапазон pH до уровня 5.0–9.0, до 60°C – диапазон pH 5.5–9.0. При 80°C вязкость ЭПС стабильна в диапазоне pH 6.0–8.0. Анализируя данные результаты, можно сделать вывод о том, что повышение температуры сужало диапазон pH, в котором гель ЭПС сохранял стабильность.

Важной характеристикой стабильности товарного биополимера является его устойчивое гелеобразование в солевых растворах. С этой целью

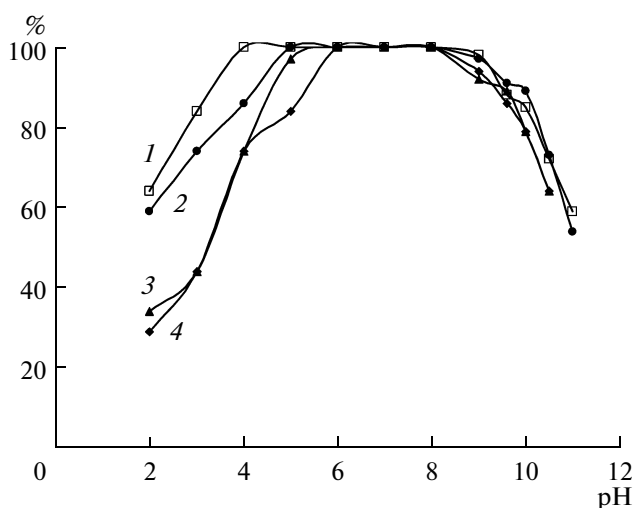


Рис. 4. Влияние pH и температуры среды на вязкость (% от исходной) ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1: 1 – 20, 2 – 40, 3 – 60, 4 – 80°C.

была изучена вязкость ЭПС в средах, где в качестве солей использовали хлориды, нитраты и сульфаты K, Na, Ca, Mg, Mn и Fe. Выбор этих солей обусловлен их наличием в компонентном составе пластовых вод. Полученные результаты по стабильности полисахарида, продуцируемого *A. vinelandii* ИБ 1, свидетельствуют о том, что его вязкостные свойства не терялись в присутствии данных солей (рис. 5).

При добавлении сульфатов в раствор ЭПС его вязкость возрастала до 146% по отношению к исходной без добавления солей. Повышение вязкости в большей степени наблюдалось под воздействием сульфатов натрия и марганца. Влияние хлоридов на вязкостную стабильность экзополисахарида отличалось от влияния сульфатов. Так, хлориды металлов понижали вязкость ЭПС до 61–84%. Хлорид железа(III), обладая сильно выраженными свойствами кислоты Льюиса, оказывал отрицательное действие на вязкость геля полисахарида, фактически высаживая его из раствора. Нитраты щелочных и щелочноземельных металлов понижали вязкость ЭПС до уровня 60–70% от исходной.

Таким образом, новый высоковязкий биополимер представляет собой экзополисахарид альгинатной структуры с преобладанием α -L-гулуриновой кислоты ($M/G = 0.22$) с молекулярной массой в интервале 250–350 кДа. Биополимер стабилен при pH 4.0–9.0 в широком интервале температур, хорошо растворяется в высокоминерализованной воде, сохраняя высокий уровень вязкости. Положительные результаты испытаний позволяют утверждать о перспективности даль-

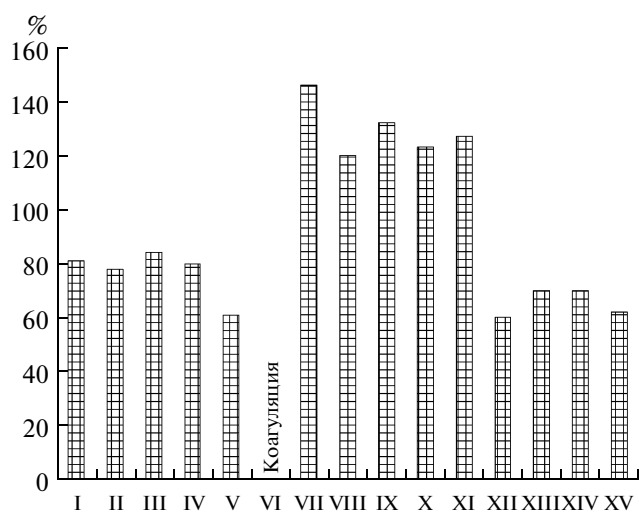


Рис. 5. Влияние солей металлов на вязкость (% от исходной) ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1. I – NaCl, II – CaCl₂, III – MnCl₂·4H₂O, IV – MgCl₂·4H₂O, V – KCl, VI – FeCl₃·6H₂O, VII – MnSO₄·5H₂O, VIII – FeSO₄·5H₂O, IX – Na₂SO₄, X – K₂SO₄, XI – MgSO₄·7H₂O, XII – KNO₃, XIII – NaNO₃, XIV – Mg(NO₃)₂·6H₂O, XV – Ca(NO₃)₂.

нейшего использования нового биополимера при проведении опытно-промышленных работ для повышения нефтеотдачи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cohen G.H., Johnstone D.B.* // J. Bacteriol. 1964. V. 88. № 2. P. 329–338.
2. *Campos M., Martinez-Salazar J.M., Lloret L., Moreno S., Nunez C., Espin G., Soberon-Chaves G.* // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 7. P. 1793–1799.
3. *Sabra A., Zeng P., Lonsdorf H., Deckwer W.D.* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 9. P. 4037–4044.
4. *Gorin P.F.J., Spenser J.F.T.* // Canad. J. Chem. 1966. V. 44. № 9. P. 993–998.
5. *Сливкин А.И.* // Вестник ВГУ. Серия химия, биология. 2000. С. 30–46.
6. *Гринберг Т.А., Смоляр С.И., Малашенко Ю.Р., Пирог Т.П., Капиловская Е.Д.* // Микробиол. журнал. 1991. Т. 53. № 5. С. 82–96.
7. *Ботвинко И.В.* // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79–122.
8. *Smidsrod O., Draget K.I.* // Carbohydr. Eur. 1996. V. 14. № 2. P. 6–13.
9. Патент РФ. 2005. № 2266324.
10. Патент РФ. 2005. № 2245918.
11. *Артюхов В.Г., Гарбаренко В.Г., Гайворонский Я.С.* Переработка мелассы на спирт и другие продукты по безотходной технологии. М.: Агропромиздат, 1985. 287 с.
12. *Захарова И.Я., Косенко Л.В.* Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наукова думка, 1982. 192 с.
13. *Усов А.И.* // Успехи химии. 1999. Т. 68. № 11. С. 1051–1061.
14. *Chen W.P., Chen J.Y., Chang S.C., Su C.L.* // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. № 3. P. 543–546.
15. *Pena C., Campos N., Galindo E.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. № 4. P. 510–515.
16. *Galindo E., Peña C., Núñez C., Segur D., Espín G.* // Microb. Cell Fact. 2007. V. 6. № 7. P. 1–16.
17. *Skjak-Braek G., Crasdalen H., Larsen B.* // Carbohydr. Res. 1986. V. 154. № 1. P. 239–250.
18. *Sutherland I.W.* // FEMS Microbiol. Rev. 1995. V. 16. № 4. P. 323–347.

Biopolymer of Alginate Nature with a Predominance of L-Guluronic Acid

Ya. O. Loginov, G. G. Khudaigulov, S. P. Chetverikov, A. I. Melent'ev, and O. N. Loginov

Institute of Biology, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

e-mail: che-kov@mail.ru

Received April 8, 2010

Abstract—Highly viscous polysaccharide (250–350 kDa) of an alginate nature with a predominance of α -L-guluronic acid (M/G = 0.22) was obtained from *Azotobacter vinelandi*. The yield of polysaccharide was 20.5 ± 0.5 g/l when cultured in a medium containing molasses at a viscosity of the cultural liquid of over 30000 cSt. The biopolymer is stable at pH 4.0–9.0 in a wide temperature range and well soluble in highly mineralized water; it retains a high viscosity level and can be used in the petroleum industry for enhanced oil recovery.